第5卷第4期　　动物学研究　　Vol. 5, No. 4
1984年11月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Nov., 1984

与豚鼠红细胞形成自然花环的狗淋巴细胞类别的探讨

吕占军　王蕙芬

（河北医学院基础医学研究所免疫室）

摘　要

本文研究了豚鼠E花环形成狗淋巴细胞（E-RFC）的类别。狗淋巴细胞于37°C孵育后，可提高E花环形成率。E-RFC与总淋巴细胞的SIg阳性率相近。E-EAC（豚鼠红细胞—抗体和补体包被的绵羊红细胞）混合花环实验表明一部分狗淋巴细胞同时具有E和补体二种受体，总淋巴细胞与补体受体淋巴细胞的E花环阳性率无显著差异。这些结果说明E受体不仅表现于一部分T细胞上，而且见于某些B细胞上。因此，不宜用E花环试验作为检测狗T细胞的方法。

1975年Bowles提出狗的T淋巴细胞与人和豚鼠的红细胞形成花环。后来由于发现狗淋巴细胞的E花环成花率较低，而否定成花细胞代表狗全部T细胞群（Esser, R. E. *et al.*, 1977; Krakowka, S. *et al.*, 1977）。本文中用EAC花环试验和膜表面免疫球蛋白(SIg)免疫荧光染色结合豚鼠红细胞自然E花环试验对E-RFC的类别进行了探讨。

材料和方法

（一）狗淋巴细胞制备

肝素抗凝的健康成年狗静脉血，或狗淋巴结细胞于比重1.077的聚蔗糖—泛影葡胺分离液上进行密度梯度分离。外周血淋巴细胞纯度仅45.1%。再按Rabinowitz (1964)的方法过玻璃珠柱，去除单核细胞和多形核白细胞。所得细胞经酸性α-醋酸萘酯酶染色判断，淋巴细胞纯度达98.8%。用Hanks液(HBSS)洗二次后，以RPMI1640培基制成2×10^6/毫升的淋巴细胞悬液。

（二）狗淋巴细胞表面标志的测定

本文1983年1月30日收到，1983年7月15日收到修改稿。

1.自然E花环形成试验　取上述淋巴细胞悬液与HBSS洗过的1%豚鼠红细胞悬液等量混合。200g离心5分钟，37°C水浴15分钟。混匀，涂片，做酯酶染色后计数。凡结合3个以上红细胞的淋巴细胞为花环阳性。每份标本至少计数200个淋巴细胞。

2.EAC花环形成试验和成花细胞分离　花环试验基本按Holm (1975) 法。以HBSS洗过的5%绵羊红细胞 (SRBC)，先后用1：1600稀释的兔抗SRBC抗血清（凝集价1：200)和新鲜小鼠血清（补体）于37°C致敏。以含钙镁的明胶—巴比妥缓冲盐水洗三次，配成0.5%EAC悬液。冰浴保存，48小时内使用。EAC与淋巴细胞悬液等体积混合，按E花环实验条件离心，染色和计数。同时以未致敏的SRBC，抗体致敏的SRBC，和经小鼠血清处理的SRBC做对照成花实验。结果这三种红细胞与狗的淋巴细胞基本都不成花。

淋巴结细胞形成EAC花环后，进行密度梯度分离。所得界面细胞为EAC成花细胞贫乏细胞群，沉淀细胞即EAC成花丰富细胞群。分别用蒸馏水溶去红细胞以后，与豚鼠红细胞做E花环实验。

3.E-EAC混合花环试验　0.15毫升狗淋巴细胞，0.15毫升EAC和0.1毫升豚鼠红细胞悬液混匀，如上做花环实验。经甲基紫染液染色后，湿片计数200～500个淋巴细胞。计出总淋巴细胞的E花环阳性率及EAC成花淋巴细胞的E花环阳性率。SRBC和豚鼠红细胞大小不同，可资区别。结合3个以上E或EAC的淋巴细胞为花环阳性，一个淋巴细胞同时结合两种红细胞各2个以上者判混合花环阳性。

4.SIg-E (或EAC) 花环双标记试验　异硫氰酸荧光素标记的兔抗狗γ球蛋白的IgG系本室自制。F/P克分子比值1.6，含2‰叠氮钠和2%牛血清白蛋白。小份额分装，-70°C保存。常规使用2个染色滴度。

过玻璃珠柱分离的外周血淋巴细胞 (PBL) 先做SIg荧光抗体染色，然后与E或EAC如上做花环实验。成花后，涂片用1：9福尔马林—乙醇液固定5分钟。再用0.1‰甲基绿液复染6分钟，使有核细胞在荧光显微镜下着橘红色。SIg^+淋巴细胞上可见黄绿色荧光斑点；红细胞呈深棕色轮廓。先计数100个淋巴细胞中的SIg阳性率和成花率，然后再计数100个成花细胞中的SIg阳性率。

（三）淋巴细胞培养

淋巴细胞用含20%小牛血清的RPMI1640培基（每毫升中含青霉素100单位，链霉素100微克）调整到1×10^6/毫升。于直径10毫米的平底塑料管中（每管1毫升细胞悬液），37°C培养不同时间后，进行花环实验和荧光抗体染色。

结　果

（一）淋巴细胞培养对E花环形成的影响

37°C孵育狗PBL 3小时以后，E花环的成花率开始上升，至24小时增加至培养前的4.3±1.6倍（范围1.9～7.8倍）。37°C培养对淋巴细胞EAC花环形成率影响不大（表1）。

（二）EAC花环与SIg标志的关系

狗PBL做SIg免疫荧光染色后与EAC做花环实验，结果看到EAC花环与SIg标志多数

重叠（表2）。

（三）E-EAC混合花环实验结果

在不培养的PBL，37°C培养24小时的PBL和淋巴结淋巴细胞中，均有一部分细胞结合EAC的同时又结合豚鼠红细胞，形成混合花环(见图1)。结果列于表3。表3的总淋巴细胞中E花环阳性率与EAC成花淋巴细胞的E花环阳性率做配对t检验，二者无显著差异（P>0.05）

表1　　37°C培养对狗PBL形成E和EAC花环的影响

培养时间（小时）	例数	E花环%（$\bar{x}$ ±SD）	例数	EAC花环%（$\bar{x}$ ±SD）
0	11	10.1± 4.6	7	20.1±3.9
24	11	39.1±18.1	7	16.3±3.3
t 检验		P<0.01		P>0.05

表2　　狗外周血淋巴细胞SIg-EAC 花环双标记实验结果

	例数	SIg⁺%（$\bar{x}$ ±SD）
总淋巴细胞	5	14.2±4.1
EAC成花淋巴细胞	4	70.8±8.5
t 检验		P<0.001

表3　　E-EAC 花环双标记实验结果

	37℃培养	例数	总淋巴细胞中E花⁺%（$\bar{x}$±SD）	EAC成花细胞中E花⁺%（$\bar{x}$±SD）	t 检验
PBL	0 时	5	5.4± 2.1	8.8± 7.8	P>0.05
PBL	24小时	5	35.8±13.1	39.0±15.1	P>0.05
淋巴结淋巴细胞	18小时	3	47.7± 6.8	42.9± 8.9	

（四）EAC 成花细胞贫乏和丰富细胞群的E花环阳性率

狗淋巴结淋巴细胞形成EAC花环后，经密度梯度分离，得EAC成花细胞贫乏和丰富两个细胞群。与原淋巴结淋巴细胞同时进行E和EAC花环测定。经分离后，沉降细胞比界面细胞EAC花环阳性率显著增高，但其E花环阳性率差别不大（表4）。EAC花环阳性率与E花环阳性率的相关系数r=0.097（P>0.05），二者无相关性。

（五）E花环阳性淋巴细胞的SIg阳性率

狗PBL做SIg免疫荧光染色后与豚鼠红细胞做E花环实验。结果无论淋巴细胞培养与否，E-RFC的SIg阳性率均与总淋巴细胞的接近（表5）。

表4　EAC成花细胞贫乏和丰富对E花环的影响（3例）

淋巴结淋巴细胞	EAC花环+%($\bar{x}$±SD)	E花环+%($\bar{x}$±SD)
原淋巴结细胞	47.5± 9.5	25.1±14.5
EAC成花贫乏	18.0± 4.6	35.2±18.0
EAC成花丰富	72.2±18.5	30.0±13.6
F检验	P<0.01	P>0.05

表5　狗外周血淋巴细胞SIg-E花环双标记实验结果

37℃培养	例数	E花环+%（$\bar{x}$±SD）	SIg+%（$\bar{x}$±SD）	
			总淋巴细胞	E-RFC
0时	3	9.3± 1.5	13.8±3.6	10.0±2.0
6小时	4	31.5±17.4	13.5±3.4	12.3±6.8

讨　论

许多文献证明B淋巴细胞表面具有SIg和补体受体，这两种标志有重叠关系。本实验发现狗外周血内形成EAC花环的淋巴细胞中70.8%同时具有SIg，与Ross（1978）在人和Arnaiz-Villena（1974）在小鼠淋巴细胞所得结果基本一致。因此可以认为狗同其它动物一样，EAC成花淋巴细胞基本代表B细胞。

在狗外周血淋巴细胞中B细胞所占比例与人和小鼠相似。根据人和其它哺乳动物的资料，除B细胞以外的大部分淋巴细胞应属于T细胞。狗外周血E-RFC中85%以上SIg⁻，加之胸腺细胞有9.2%的E-RFC（Onions，D.，1977），说明T细胞上具有E受体，而且狗外周血淋巴细胞的E-RFC多数属于T细胞。狗PBL的E花环成花率只有10%左右，纵便37°C培养以后成花率上升，也仅有39.1%。显然并非所有的T细胞上都有E受体。

在双标记实验中看到，E-RFC与总淋巴细胞的SIg阳性率接近；EAC成花淋巴细胞中约40%形成E花环，证明E受体也存在于一部分B细胞上。用EAC花环沉降法分离狗淋巴结T、B细胞，无论T细胞还是B细胞丰富细胞群中，都有30%左右的细胞形成E花环，进一步证实B细胞上有E受体。此结果与Bowles（1975），Zander（1975）和Beall（1974）的报道不一致。这些作者发现E花环+淋巴细胞没有或仅有少部分SIg+；荧光素标记的抗狗胸腺细胞抗体着染大部分E花环+淋巴细胞；E与EAC花环标志互不重叠，因此认为形成E花环是T细胞的特征。他们采用密度梯度法分离狗外周血淋巴细胞，并未特别提到辨认和去除非淋巴白细胞，以致获得了较高比例的E花环成花率

(32.4%和38.4%)。而注意辨认成花细胞类别的作者所获淋巴细胞E花率均在10%左右，并证明淋巴、单核和多形核三种类型的白细胞皆可形成E花环，而且非淋巴白细胞的成花率高于淋巴细胞（Esser, R. E. et al.; Krakowka, S. et al.)。所以我们认为Bowles等观察到的成E花环的细胞中可能有非淋巴白细胞。

综上所述，本文结果证明：狗淋巴细胞E受体不是T细胞独有的特征，而是一部分T、B淋巴细胞共有的膜标志。因此，不宜用E花环试验作为计数狗T细胞的方法。

Cockerell (1979) 于37°C孵育猫的外周血淋巴细胞，使其与豚鼠红细胞的成花率大幅度上升，这与我们在狗获得的结果类似。猫的成花细胞增加是37°C依赖的。狗则不同，淋巴细胞于冷环境中孵育E花环阳性率亦有上升（本实验室未发表资料）。而人外周血淋巴细胞在37°C孵育后，SRBC花环形成率降低（McConnell, I. et al., 1976)。这些差异可能反映狗同猫和人的E受体在本质上有所区别。

参考文献

Arnaiz-Villena, A. *et al*. 1974 Rosette formation by mouse lymphocytes Ⅰ. T-cell specificities in a CRL subpopulation. *Clin. Exp. Immunol.* 18: 177—186.

Beall, G. N. *et al*. 1974 Canine lymphocytes that form rosettes with human red blood cells. *J. Surg. Res.* 17: 330—337.

Bowles, C. A. *et al*. 1975 Rosette formation by canine peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 114: 399—402.

Cockerell, G. L. *et al*. 1979 Increased spontaneous erythrocyte rosette formation of feline lymphocytes preincubated at 37℃. *J. Immunol. Methods* 28: 369—379.

Esser, R. E. *et al*. 1977 Rosette formation by canine leukocytes with human erythrocytes. *Transplantation* 24: 223—225.

Holm, G. *et al*. 1975 Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of healthy persons. Characterization by surface markers and lack of selection during purification. *Clin. Exp. Immunol.* 20:443—457.

Krakowka, S. *et al*. 1977. Rosette formation assays in dogs:Lack of specificity of E rosettes for T lymphocytes. *Infect. Immun.* 17: 73—77.

McConnell, Ⅰ. *et al*. 1976 Lymphocyte receptors Ⅰ. Receptors for rabbit IgM on human T lymphocytes. *Immunology* 30:835—839.

Onions, D. 1977 B-and T-cell markers on canine lymphosarcoma Cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 59: 1001—1006.

Rabinowitz, Y. 1964 Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations. *Blood* 23: 811—828.

Ross, G. D. *et al*. 1978 Surface markers of complement receptor lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 62: 1086—1092.

Zander, A. R. *et al*. 1975 Surface markers on canine lymphocytes. *Transplant Proc.* 7: 369—373.

IDENTIFICATION OF CATEGORIES OF CANINE LYMPHOCYTES FORMING SPONTANEOUS ROSETTES WITH GUINEA PIG ERYTHROCYTES

Lü Zhanjun Wang Hueifen

(Institute of Basic Medicine, Hebei Medical College, Shijiazhuang)

Categories of canine lymphocytes forming rosettes with guinea pig erythrocytes (E-RFC) were studied. The incubation of canine lymphocytes at 37°C increased E-rosette formation. The percentages of SIg positive cells in E-RFC were similar to those in total lymphocytes. In mixed E-EAC (guinea pig erythrocytes-sheep erythrocytes coated with antibody and complement) rosette assays, a portion of canine lymphocytes having both E and complement receptors has been detected. No significant difference was found in the mean percentages of E-RFC between total lymphocytes and EAC-rosetting ones. On the basis of these results we assume that the E receptors are present on a part of T cells and also on some B cells. Thus, the E-rosette assay cannot be used for detection of canine T cells.